《基于皮肤模型的皮肤腐蚀性与刺激性的整合测试评估方法（征求意见稿）》编制说明

《基于皮肤模型的皮肤腐蚀性与刺激性的整合测试评估方法》

标准编制组

二〇二一年九月

项目名称：基于皮肤模型的皮肤腐蚀性与刺激性的整合测试评估方法

项目统一编号：SHSOT-2020-B08

承担单位：广州市华代生物有限公司，云南贝泰妮生物科技集团股份有限公司，片仔癀（上海）生物科技研发有限公司，上海化工研究院，上海交通大学医学院，上海市疾病预防控制中心，无限极（中国）有限公司，欧莱雅研发创新中心，上海斯安肤诺生物科技有限公司，欧诗漫生物股份有限公司，上海微谱化工技术服务有限公司，沈阳沈化院测试技术有限公司，等。

编制组主要成员：冯鉴鸿，等。

本文件首批执行单位：广州市华代生物有限公司，云南贝泰妮生物科技集团股份有限公司，片仔癀（上海）生物科技研发有限公司，上海化工研究院，上海交通大学医学院，上海市疾病预防控制中心，欧莱雅研发创新中心，欧诗漫生物股份有限公司，沈阳沈化院测试技术有限公司，等。

《基于皮肤模型的皮肤腐蚀性与刺激性的整合测试评估方法（征求意见稿）》编制说明

目录

一、工作情况.....5
1、项目背景.....5
2、任务来源.....5
3、主要工作过程.....5
二、标准编制原则和制标依据.....7
1、解决毒性测试替代方法组合的问题.....7
2、提高化学品毒性预测的准确性.....8
3、实践化妆品 IATA 测试策略.....8
4、确定标准主要内容的依据.....9
1、国内外主要皮肤模型.....9
2、国内相关分析方法研究状况.....9
三、标准结构.....9
单击或点击此处输入文字。.....9
1 范围：
3、术语和定义.....9
4、符号和缩略语.....10
5、原理.....10
6.测试策略与评估过程.....11
6.1 范围和策略.....11
6.2 皮肤模型的刺激性测试 12
6.3 皮肤模型腐蚀性测试.....12
6.5 方法性能和可接受标准.....12
6.6 结果解释和预测模型.....12
7.数据和报告.....13
7.1 数据.....13
7.2 实验报告内容.....13
四、方法验证方案.....14
1、方法实验室内验证情况.....14
2、简化验证情况.....15
3、 参考物质选择.....16
4、 验证结果分析.....16
五、预期经济效果.....18
1、推动化妆品行业替代方法的实施.....18
2、推动组合替代方法的实施.....19
六、采标程度，国内外同类标准水平对比情况.....19
七、重大分歧意见的自理和其他需要说明的事项.....20

一、工作情况

1、项目背景

随着日用化学工业的发展和消费市场规模的扩大，消费者皮肤暴露于大量日化工业产品中，如化妆品、洗护用品、家居用品和消毒产品等。可能造成皮肤的腐蚀性或刺激性。法规对于皮肤接触产品的安全性作出了严格的规定。传统的测试方法使用实验动物，由于涉及动物福利，加上成本高、难定量和动物结果外推到人的不确定性。使得开发非动物的替代方法成为法规和测试的需求。目前用于化学品的皮肤腐蚀性和刺激性的方法主要有离体大鼠皮肤电阻测试、基于重建皮肤模型的腐蚀性测试、蛋白变性测试、基于重建皮肤模型的刺激性测试等。目前动物试验替代方法的研发和转化应用面临解决四个重要问题：一是单一方法的局限性，通过建立整合测试策略（IATA）来解决；二是复杂毒理学终点替代方法开发的问题，通过建立以有害结局通路(AOP)为主要指导原则的方法开发思路；三是标准化方法转化应用中的质量控制和优化的问题，通过建立实施指南进行规范。四是新技术和方法的验证问题，通过建立针对性验证指南和实施解决。本标准针对第一个问题，以化学品/化妆品皮肤刺激性和腐蚀性的替代方法组合测试为目标，建立毒性预测的整合方案。

2、任务来源

2020年12月，上海市毒理学会标委会审议通过了第二批团体标准立项申请，“基于皮肤模型的腐蚀性和刺激性的整合测试评估方法”通过立项，立项编号：SHSOT-2020-B08。标准完成后将成为国内第一个基于IATA策略的试验方法标准，为化学品和化工产品的安全性建立快速、高效和准确的检测依据。标准参与单位有广州市华代生物有限公司，云南贝泰妮生物科技集团股份有限公司，片仔癀（上海）生物科技研发有限公司，上海化工研究院，上海交通大学医学院，上海市疾病预防控制中心，无限极（中国）有限公司，欧莱雅研发创新中心，上海斯安肤诺生物科技有限公司，欧诗漫生物股份有限公司，上海微谱化工技术服务有限公司，沈阳沈化院测试技术有限公司，等。

我国化学品毒性测试非动物方法的标准化只有不到 20 年的时间，最早于 2006 年开始由出入境检验检疫机构编制和发布了我国第一批化妆品和化学品替代方法行业标准。除了在进出口商品检验检测中使用外，还在化妆品行业推广。2016 年《化妆品安全技术规范》接受了 3T3 中性红摄取光毒性试验方法。之后，皮肤刺激的大鼠经皮电阻试验、皮肤致敏的直接多肽结合试验、眼刺激的短期暴露试验等多个方法被接受。

3、主要工作过程

1）成立标准编制组

2020 年 8 月，成立了由上海交通大学医学院程树军博士任组长，广州华代生物冯鉴鸿任副组长，上海市疾病预防控制中心、贝泰妮、欧诗漫、上海斯安肤诺和欧莱雅等公司代表参与的标准编制小组。制订项目实施计划，启动标准验证研究。

2）相关标准资料研究

查询国际标准文件，以OECD化学品健康毒理学相关的准则和导则文件为主，以ICCVAM、EURL-ECVAM、UN GHS等文件。分析范围包括IATA、GIVIMP、TG系列、DG系列、AOP系列、工作报告等。国内标准以GB、SN等为主。如OECD DG 203、OECD TG 431、OECD TG 439、OECD 329、 SN/T4577-2016、GB/T27830-2011

3）研究文献

研究近5年来，皮肤模型用于皮肤腐蚀性和刺激性的研究文献，以及IATA用于皮肤腐蚀性和刺激性的其他组合方案。

Alépée, N., Grandidier, M., Cotovio, J., 2014. Sub-categorisation of skin corrosive chemicals by the EpiSkinTM reconstructed human epidermis skin corrosion test method according to UN GHS: revision of OECD test guideline 431. Toxicol. in Vitro 28, 131–145.

Alépée, N., Grandidier, M., Tornier, C., Cotovio, J., 2015. An integrated testing strategy for in vitro skin corrosion and irritation assessment using SkinEthicTM reconstructed human epidermis. Toxicol. in Vitro 29, 1779–1792.

Alépée, N., Grandidier, M., Cotovio, J., 2019. Usefulness of the EpiSkinTM reconstructed human epidermis model within integrated approaches on testing and assessment (IATA) for skin corrosion and irritation. Toxicol. in Vitro 54, 147–167.

Desprez, B., Barroso, J., Griesinger, C., Kandárová, H., Alépée, N., Fuchs, H.W., 2015. Two novel prediction models improve predictions of skin corrosive sub-categories by test methods of OECD test guideline no. 431. Toxicol. in Vitro 29, 2055–2080.

Jung, K.M., Lee, S.H., Jang, W.H., Jung, H.S., Heo, Y., Par, Y.H., Bae, S., Lim, K.M., Seok,
S.H., 2014. KeraSkinTM-VM: a novel reconstructed human epidermis model for skin irritation tests. Toxicol. in Vitro 28 (5), 742–750.

Kojima, H., Katohb, M., Shinodac, S., Hagiwarac, S., Suzukid, T., Izumid, R., Yamaguchie, Y., Nakamurae, M., Kasahawaf, T., Shibaif, A., 2014. A catch-up validation study of an in vitro skin irritation test method using reconstructed human epidermis LabCyte EPI-MODEL24. J. Appl. Toxicol. 34, 766–774.

Li, N., Liu, Y., Qiu, J., Zhong, L., Alépée, N., Cotovio, J., Cai, Z., 2017. In vitro skin irritation assessment becomes a reality in China using a reconstructed human epidermis test method. Toxicol. in Vitro 41, 159–167.

Liu, Y., Li, N., Chen, L., Zhong, L., Zhou, M., Pan, L., Chen, D., Gu, W., Li, Y., Wang, W., China: implementation of skin corrosivity potential using in vitro reconstructed human epidermis. Toxicol. in Vitro 52, 321–331.

4）召开研讨会，制订方法验证程序

2020 年 8 月 27 日，起草小组在上海化工院召开了标准起草启动会，邀请行业内专家召开专题讨论会，就标准编制的重点、难点和关键问题进行充分研讨，确定验证方案，确定参与验证单位为广州华代、贝泰妮、片仔癀、上化院等 5 家实验室。2020 年 9 月份开展标准的验证工作，通过线上和线下会议研讨和讨论等多种方式对标准验证的各个环节，包括样品采购、制盲、分装、分发，方法 SOP 确认、培训、实验室现场考察、数据统计等具体工作。2021 年 3 月，学会在万象城会议室召开标准立项会议，汇报了标准起草进展。在 7 月 17 日召开的 2021 年度标准启动会上，汇报了标准的验证情况。9 月 17 日编制组召开了标准预审会议，讨论标准文本草案和编制说明。

5）组织方法验证工作

（1）2020.7-2020.12 年，选择 2 种皮肤刺激物和 2 种皮肤腐蚀物在三家实验室完成全部验证，华代生物、贝泰妮和片仔癀。

（2）2021.1 年-2021.3，选择 2 种皮肤刺激物和 2 种皮肤腐蚀物在三家实验室完成部分验证，上海 CDC、上化院、沈化院。

（3）2021.3-2021.7，完成验证数据的统计分析。

二、标准编制原则和制标依据

1、解决毒性测试替代方法组合的问题

随着全球化学品使用量的广泛大量的增加，不同国家均立法要求严格监管化学品的安全使用和运输，以保护人类和环境健康。大多数国家要求按照联合国发布的全球化学品统一分类和标签制度（Globally Harmonized System of classification and labeling of chemicals, GHS)对化学品和产品进行标识。GHS 是一项统一的化学品危害分类制度，包括潜在的皮肤腐蚀或刺激性。为了减少对动物的使用并最大限度地利用现有数据，经济合作与发展组织(Organization for Economic Cooperation and Development, OECD 经合组织)于 2014 年制定了一份关于皮肤腐蚀性和刺激性的整合测试评估方法的指导文件(Integrated Approaches to Testing and Assessment, IATA)。该方法也被欧洲化学品管理局(European Chemicals Agency, ECHA)和 GHS 提议采用。

该指南提供了关于如何整合所有现有的和新产生的关于化学品腐蚀性和刺激性潜力的信息，以便进行分类和标签。指南包含的 8 个模块被确定为 IATA 皮肤危害识别的关键要素，8 个模块可进一步分为三个部分:第一部分关于现有数据，包括人体、体内、体外、物理化学特性和非测试方法，第二部分关于对第一部分收集的可用数据进行证据权重分析，第三部分是关于生成新的测试数据。第三部分仅在第二部分 WoE 分析不确定时进行，新的测试将从由第二部分 WoE 分析得到的假设的体外方法开始。该假设能够表明获得最有可能的腐蚀性/刺激性的分类，以及后续采取自下而上的或者自上而下的预期测试顺序策略。当这种化学物质

被假定为没有刺激性时，采用自下而上的策略(先进行皮肤刺激后进行皮肤腐蚀测试)。另一方面，当该化学品被假定为具有腐蚀性或刺激性时，执行自上而下的策略(先进行皮肤腐蚀后进行皮肤刺激测试)。

2、提高化学品毒性预测的准确性

我国国家标准GB 30000定义了“28个化学品分类和标识的强制性安全标准”，每个标准对应于联合国GHS的一个危险类别。关于皮肤刺激性和腐蚀性，皮肤腐蚀类别中的三个子类(1A、1B和1C)、刺激性(类别2)和轻度刺激(类别3)是基于参照GB 30000.19的体内兔试验。尽管中国没有进行非动物试验的具体法律或法规，但从遵守“3R”原则(减少、优化和替换)的积极角度来看，中国积极参与替代研究工作的推广，并对化妆品安全评估中的替代方法持开放态度。2016年开始，化妆品化学成分的3T3中性红吸收(NRU)光毒性试验、大鼠经皮电阻(TER)试验已被纳入中国化妆品安全技术规范，标志着动物替代方法正式进入中国化妆品标准体系。此外，自2015年以来，中国一直以观察员身份参与替代测试方法国际合作（International Cooperation on Alternative Test Methods, ICATM)。近年来，各种研究机构和权威实验室做出了大量努力,使得替代方法在科学上和化妆品行业都取得了重大进步。广泛应用的一个例子是中国EpiSkin。作为中国首个商业化的RhE模型，先前的研究已经证明了其对皮肤刺激和腐蚀评估的稳健能力。与此同时，一些国内权威实验室已经建立了体外RhE测试方法，使用中国EpiSkin进行皮肤腐蚀和刺激评估。中国国家质量监督检验检疫总局2016年发布了推荐的化妆品体外皮肤刺激试验检验行业标准(AQSIQ SN/T 4577)。为了促进整合测试策略在中国的应用，同时也作为对目前标准体系的补充，本标准旨在通过对代表不同化学品类别和物理状态的60种化学品应用综合测试策略，评估IATA策略下EpiSkin™的使用情况。根据GHS制度进行统计分析，以确定预测能力，并调查自下而上和自上而下测试策略之间的一致性。

3、实践化妆品IATA测试策略

2016 年《化妆品安全技术规范》接受了 3T3 中性红摄取光毒性试验方法。之后，皮肤刺激的大鼠经皮电阻试验、皮肤致敏的直接多肽结合试验、眼刺激的短期暴露试验等多个方法被接受。但目前已发布的国家标准、行业标准和团体标准存在以下问题：

1）、缺少规划，没有形成整体评测系统，对每个毒性终点的评价方法缺少整体梳理；

2）、单一替代方法数量少且比较分散，替代方法只见树林，不见森林；

3）、替代方法普遍缺少应用场景及数据积累，缺少实际应用的规范性指导文件；

4）、行业数据还比较少，特殊样品的测试，如混合物、产品和特殊样品的公开数据；

5）、缺少组合方案，缺少 IATA 策略的尝试；

6）、替代方法的实验结果与风险评估脱节；

7）、对现有方法的优化缺少指南；

8）、对新技术的应用和新方法开发缺少指南；

4、确定标准主要内容的依据

1）、国内外主要皮肤模型

目前，可使用的经过验证的重建人类表皮有几种商品化的模型，见下，如 EpiSkin、EpiDerm™ (EPI-200) 和 SkinEthic™，可用于 IATA 框架中，当现有第三部分。此外，日本开发的 LabCyte EPI-MODEL 被 OECD 皮肤刺激的 TG 439 和皮肤腐蚀的 TG 431 采用。另一个例子是 KeraSkin，通过了韩国替代方法验证中心的验证研究，可用于皮肤刺激。根据 OECD IATA 指南文件，构成 IATA 组成的方法应当是 DA 方法，即已通过正式验证并被监管承认的方法。符合这一标准的基于皮肤模型的方法仅限下表中的 6 种模型。

表 OECD认可的商品化3D重建组织模型

名称	特点	供应商
EpiSkin™, EpiDerm™ SIT (EPI-200),SkinEthic™ RHE,LabCyte EPIMODEL24, epiCS®,Skin+®	正常人来源的表皮细胞构建的表皮模型	分别由法国EpiSkin、美国MatTek、法国SkinEthic、日本 J-TEC、德国ATERA SAS Cell Systems、法国Sterlab生产

2）、 国内相关分析方法研究状况

目前，国内可商品化采购的皮肤模型有多种，但经过验证的模型只有 Episkin，因此，选择作为本标准推荐使用的皮肤模型。国内的其他皮肤模型如果根据 OECD 指南文件“关于 OECD439 方法实施指南”的要求通过一致性评价或验证，可以成为本标准的选择模型，进入追加验证的程序。

三、标准结构

单击或点击此处输入文字。

1 范围：规定了方法的适用范围，化学品的皮肤刺激性及腐蚀性的风险评价，化学品进行更准确的分类识别，用于更准确评估化学品潜在的皮肤危害。化妆品、农药、消毒产品等可能的皮肤接触物品的皮肤腐蚀性或刺激性的测试。基于皮肤模型的整合测试策略的原则、内容、方法和技术要求。

2、规范性引用文件

3、术语和定义

列举了 8 个术语，如皮肤腐蚀性、皮肤刺激性、UPLC、UVCB、测试和评估的整合方法、证据权重、定义性方法、有害结局通路。8 个缩略语，如 C&L、ODST、KU、KT、ODST-MTT1、NSC%、TD &TK、PBK 。

4、 符号和缩略语

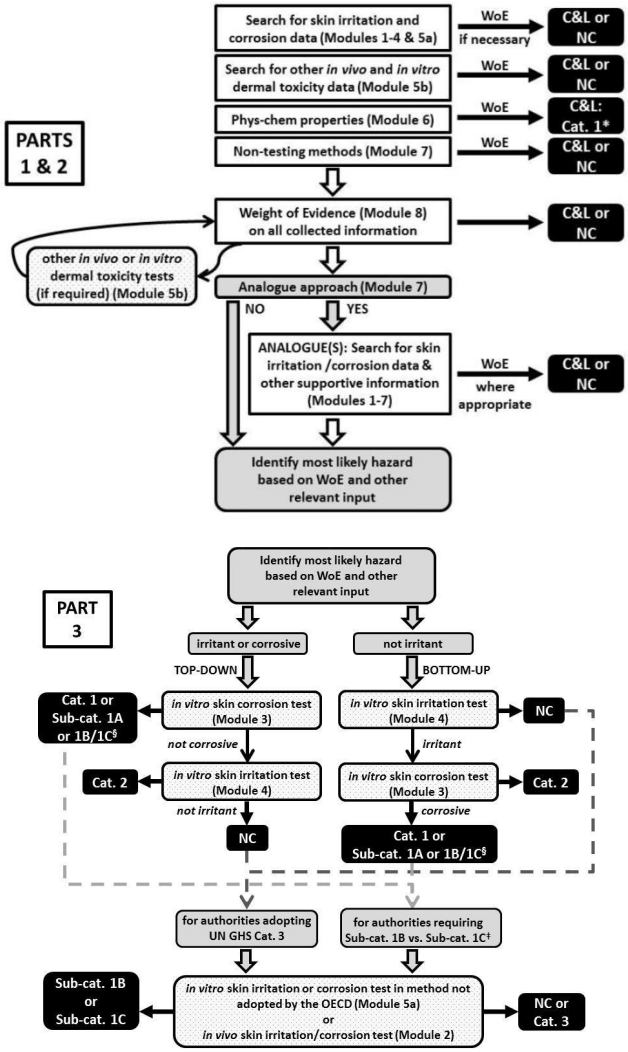
5、原理

5.1 整合测试策略原则

包括：5.1.1 IATA 概念，5.1.2 定义性方法和判定性方法，5.1.3 证据权重，5.1.4 IATA 组成来源，5.1.5 IATA 的适用性，

5.2 皮肤腐蚀性和刺激性的 IATA 方案

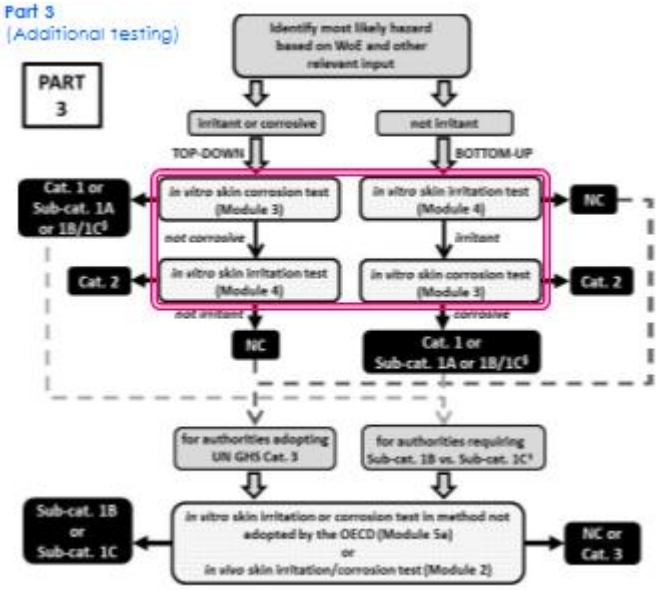
皮肤腐蚀性和刺激性的 IATA 方案由三个部分 8 个模块组成。如下图所示：第一部分是现有数据，可从文献和数据库以及其他可靠的来源获取有用信息，用于模块 1 到 5。模块 6 理化性质中主要考虑 pH 值。模块 7 中包含有非测试方法，如用于化学物的(Q)SAR、交叉参照、分类和专家系统以及用于混合物的过渡性原则和可加性理论。第二部分包括模块 8 证据权重分析，如果 WoE 分析对潜在皮肤刺激性和腐蚀性具有不确定性，那么需要进行第三部分附加测试，优先采用体外方法，动物实验建议作为最后选择。



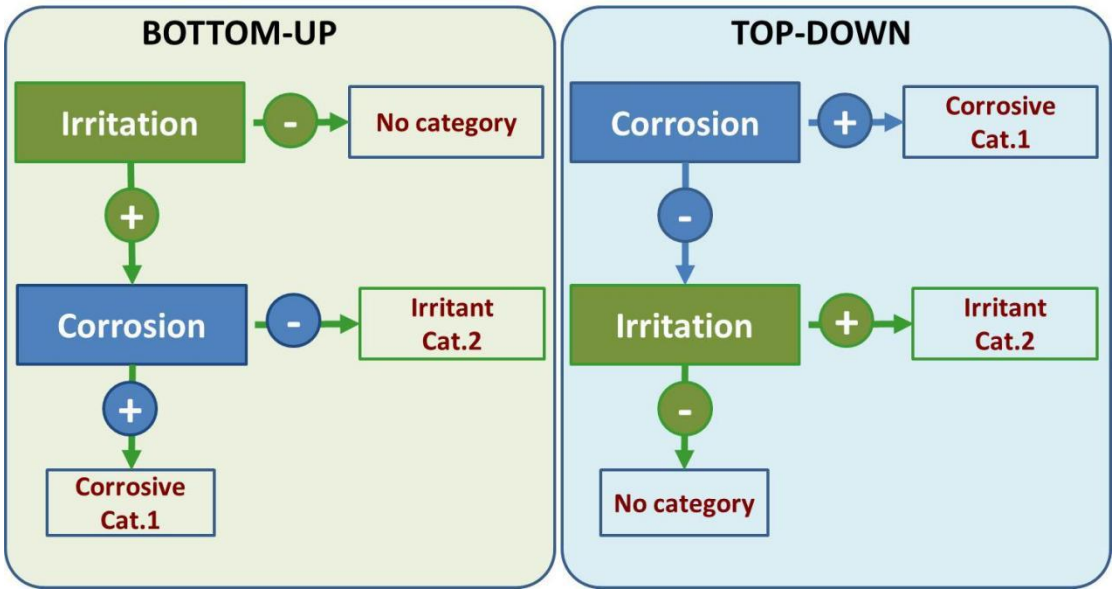
6.测试策略与评估过程

6.1 范围和策略

基于表皮模型的体外预测腐蚀性和刺激的 IATA 方法主要用于模块 3-5，当现有资料的证据权重分析不足以得出确定性的分类和标识时，作为一种实验步骤最优、获得结果最可靠的组合方式，用于测试物质准确的证据权利分析。具体可采用自下而上策略（即先进行皮肤刺激测试，再进行皮肤腐蚀测试）或自上而下策略（即先进行皮肤腐蚀测试，再进行皮肤刺激性测试）。



本标准最大的特点是实验前的预判，以及如何通过简单的组合，补充安全性评价中数据的不足，提高毒性预测的确定性。基于以上原则，本标准实际上是回答皮肤毒性的分类问题，即腐蚀性和刺激性，在此基础上实现来分类，即程度问题。因此，可采取的策略是“自下而上策略”和“自上而下策略”。



6.2 皮肤模型的刺激性测试

实验过程见规范性附录 A。

6.3 皮肤模型腐蚀性测试

实验过程见规范性附录 B。

6.4 干扰因素

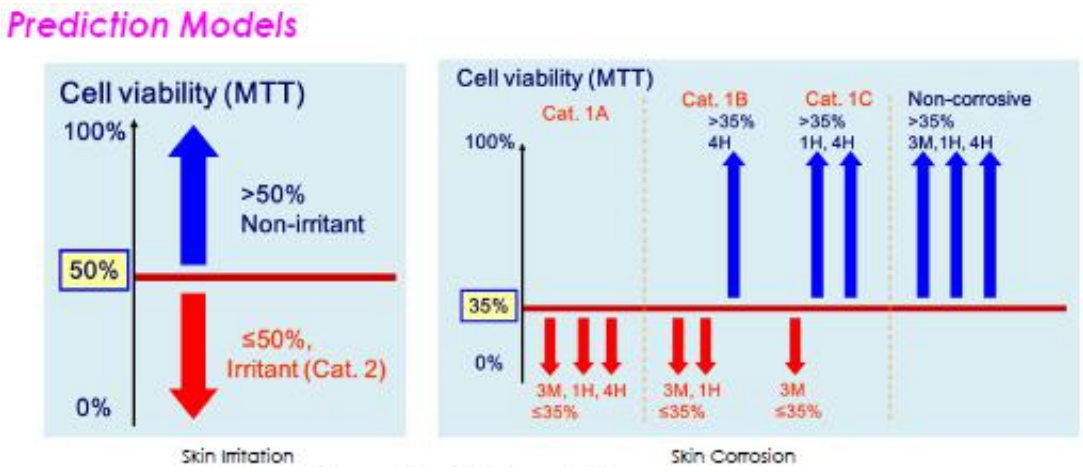
基于皮肤模型的方法除了对皮肤模型质量的主要求之外，最重要的是排除样品的干扰，关键的几点如：样品是否为MTT还原剂？有色化学品是否造成酶标仪读数的干扰？检测方法本身的干扰。

6.5 方法性能和可接受标准

规定了决定组合方法实施效能的要求，首先包括（6.5.1）皮肤模型的可接受标准，规定了满足皮肤刺激性和腐蚀性测试的体外重建的三维组织应具备的细胞活性、屏障功能、组织形态学等基本要求。其次，是（6.5.2）组合方法的可重复性要求，规定了方法在实验室内和实验室间的可重复性要求及数值；第三是（6.5.3）组合方法的可接受标准，包括实验组、阳性对照、阴性对照等的具体要求。

6.6 结果解释和预测模型

本条规定了结果计算的方法，以及皮肤刺激性预测和皮肤腐蚀性预测的模型。



7.数据和报告

7.1 数据

7.2 实验报告内容

7.2.1 测试化学品和对照化学物质:

7.2.2 使用的重建皮肤模型和实验方法(以及基本原理，如果适用)

7.2.3 实验步骤

7.2.4 结果

7.2.5 6 结论

规范性附录 A：基于皮肤模型的皮肤刺激性测试方法

A1 准备工作

A1.1 检查重建表皮检测试剂盒（0d）

A1.2 待测样品与 MTT 反应

A1.3 模型接收

A1.4 制备无活性组织

A2. 实验步骤

A2.1 准备

A2.2 加样方式

A2.3

A2.4 甲臜提取

A2.5 读数：

A2.6 计算各组 OD 值

A3. 结果计算

A3.1 计算 OD 值

A3.2 MTT 干扰物质的结果计算

A3.3 有颜色干扰物质的结果计算

规范性附录 B：基于皮肤模型的皮肤腐蚀性测试方法

B1. 准备工作

B1.1 检查重建表皮模型试剂盒（Od）

B1.2 待测样品与 MTT 反应

B1.3 模型接收

B1.4 制备无活性组织

B2. 实验步骤

B2,1 准备

B2.3 甲臜提取

B2.4 读数

B2.5 计算各组 OD 值

B3 计算 OD 值

资料性附录 C 参考物质表

C1 皮肤刺激性参考物质表

C2 皮肤腐蚀性性参考物指标

四、方法验证方案

1、方法实验室内验证情况

本标准正文实验部分包括自下而上和自上而下两个整合测试策略，验证使用的化学品来源于一组 60 种代表各种化学品类别，方法开发单位对 60 种物质进行了大规模的组合测试，这些化合物包括有机酸/碱/中性、无机酸/碱/盐和表面活性剂)和物理状态(液体和固体)。代表性如下：

60 chemicals were selected according to the following criteria:
- Commercially available, well defined chemical structure
- Clear *in vivo* sub-categories:
  NC, Cat 2, Cat 1B/1C and Cat 1A (***Figure 2a***)
- Various chemical classes and physical states (***Figure 2b***)

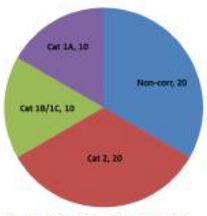


Figure 2a. *In vivo* sub-categories

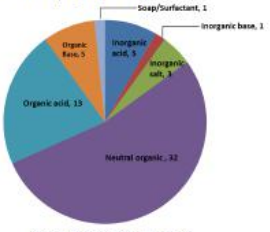
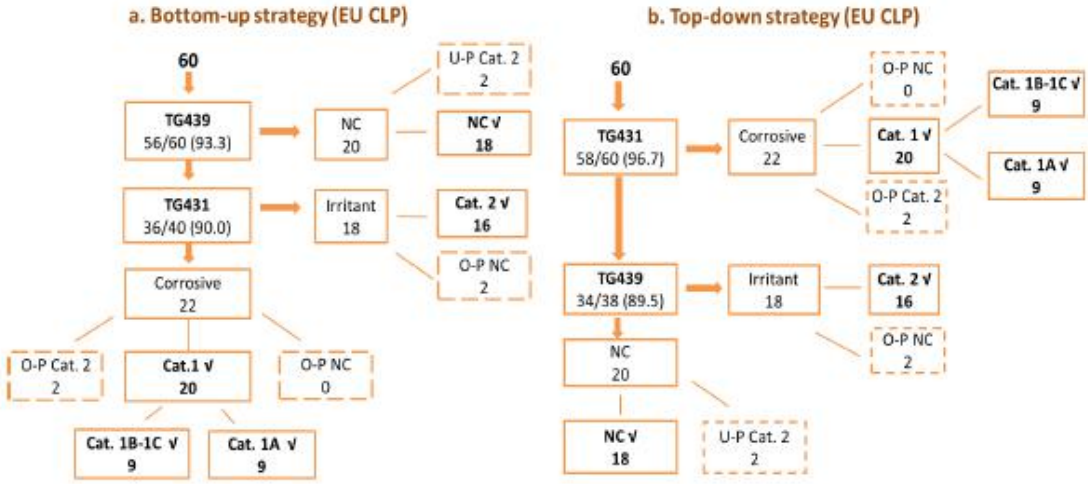


Figure 2b. Chemical classes

60 种化合物的预测过程和统计数据如下，结果表明，采用 IATA 方案，对于刺激性的亚分类达到了 90%。相关的验证文章已于 2020 年发表在国际知名期刊，Toxicology in vitro。



	Bottom-up strategy		Top-down strategy	
	Predictions/total	%	Predictions/total	%
non-classified correct	**18/20**	**90.0**	**18/20**	**90.0**
non-classified over predicted as Cat. 2	2/20	10.0	2/20	10.0
non-classified over predicted as Cat. 1B-1C	0/20	0.0	0/20	0.0
non-classified over predicted as Cat. 1A	0/20	0.0	0/20	0.0
Cat.2 correct	**16/20**	**80.0**	**16/20**	**80.0**
Cat. 2 under-predicted as non-classified	2/20	10.0	2/20	10.0
Cat. 2 over-predicted as Cat. 1B-1C	2/20	10.0	2/20	10.0
Cat. 2 over-predicted as Cat. 1A	0/20	0.0	0/20	0.0
Cat. 1 overall correct	20/20	100.0	20/20	100.0
Cat. 1B-1C correct	**9/10**	**90.0**	**9/10**	**90.0**
Cat. 1B-1C under-predictied as non-classified	0/10	0.0	0/10	0.0
Cat. 1B-1C under-predictied as Cat. 2	0/10	0.0	0/10	0.0
Cat. 1B-1C over-predictied as Cat. 1A	1/10	10.0	1/10	10.0
Cat. 1A correct	**9/10**	**90.0**	**9/10**	**90.0**
Cat. 1A under-predicted as non-classified	0/10	0.0	0/10	0.0
Cat. 1A under-predicted as Cat. 2	0/10	0.0	0/10	0.0
Cat. 1A under-predicted as Cat. 1B-1C	9/10	90.0	9/10	90.0
Accuracy (Non-class vs. class)	**56/60**	**93.3**	**56/60**	**93.3**
Accuuracy (Non-Cat. 1 vs. Cat. 1)	**58/60**	**96.7**	**58/60**	**96.7**
Overall accuracy for (sub) Cat. (Non-class, Cat. 2, Cat. 1B/1C, Cat. 1A)	**54/60**	**90.0**	**54/60**	**90.0**

2、简化验证情况

1）、验证的组织

参与验证测试单位：广州华代 （L1）、上海贝泰妮 （L2）、上海化工研究院（L3）、沈阳化工研究院（L4）、片仔癀（L5）；由上海交通大学医学院转化毒理学团队组织验证，技术支持单位为欧莱雅中国研发和创新中心和广州华代生物科技有限公司。皮肤模型生产单位：上海斯安肤诺生物科技有限公司。验证核查人员：由上海市毒理学会委托具有 CNAS 认可资质的评审员 2 人担任。

2）、验证实施

2020 年 12 月-2021 年 5 月，进行实验测试部分

2021 年 3-5 月，数据分析

2021 年 6-8 月，完善标准文本，完成编制说明

3、参考物质选择

OECD 指南 439 方法和 431 方法在参与验证实验室已实施多年，其中使用最久的华代公司使用该指南已超过 9 年，其他实验室也是大于 3 年的使用历史。针对本项目，选择了简化版验证。项目基于 OECD TG 431 和 439，选取 4 种的参考化学物，进行编码分发至参与实验测试单位。对每个选取参考化学物分别在两个实验室进行测试。每个参与测试实验的实验室需测试 1-4 个化学物 （2 轮，皮肤刺激性 和/或 皮肤腐蚀性）。每个参与实验室的测试结果和 UN GHS 分类进行比对分析，以确定团体标准的建立。

类别	**CAS#**	**化学品名**	**物理性质**	**皮刺测试参与实验室及编码**	**皮腐测试参与实验室及编码**
NC	86-87-3	1-萘乙酸	固体	L1（A11） L2（B25）	L1（A11） L2（B25）
Cat 2	111-25-1	溴己烷	液体	L1（A32） L2（B48）	L1（A32） L4（E33）
Cat 1B/1C	563-96-2	乙醛酸水合物	固体	L1（A52） L2（B66）	L1（A52） L5（D63）
Cat 1A	13319-75-0	二水合三氟化硼	液体	L1（A79） L2（B87）	L1（A79） L3（D81）

4、验证结果分析

4.1 阴性对照和阳性对照

皮肤刺激性测试（OECD TG439）和腐蚀性测试对照组数据分如下图：

TG439 标准所有批次实验的阴性对照组吸光光度值（OD）均符合 OECD TG439 标准，所有批次实验的阳性对照组细胞活性值（via%）均符合 OECD TG439 标准。TG431 测试中所有批次实验的阴性对照组吸光光度值（OD）均符合 OECD TG431 标准，所有批次实验的阳性对照组细胞活性值（via%）均符合 OECD TG431 标准。

❖ 皮肤刺激性测试（OECD TG439）对照组数据分析

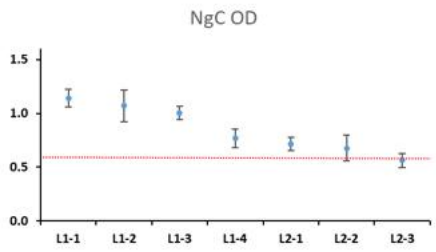


图1a. 不同批次实验阴性对照组吸光光度值（OD）

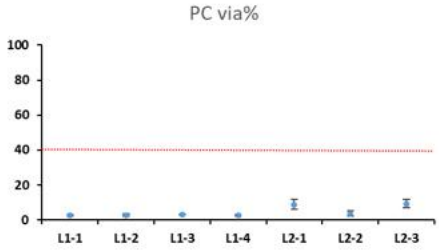


图1b. 不同批次实验阳性对照组细胞活性值(via%)

❖ 皮肤腐蚀性测试（OECD TG431）对照组数据分析

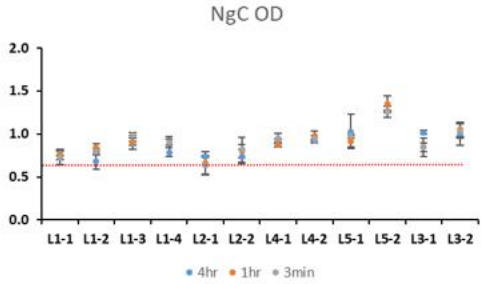


图2a. 不同批次实验3个处理时间点的阴性对照组吸光光度值（OD）

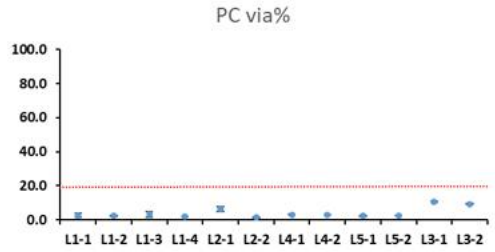


图2b. 不同批次实验阳性对照组细胞活性值(via%)

4.2 皮肤腐蚀性的分类结果

CAS#	第一组第一轮					第一组第二轮					第二组第一轮					第二组第二轮				
	4hr via%	1hr via%	3min via%	Prediction	Lab	4hr via%	1hr via%	3min via%	Prediction	Lab	4hr via%	1hr via%	3min via%	Prediction	Lab	4hr via%	1hr via%	3min via%	Prediction	Lab
86-87-3	46.7	101.5	104.5	Non-corr	L1	77.4	92.0	107.9	Non-corr	L1	98.0	93.1	97.4	Non-corr	L2	127.9	101.8	99.4	Non-corr	L2
111-25-1	67.5	108.4	103.7	Non-corr	L1	80.8	95.5	108.7	Non-corr	L1	77.9	132.4	108.7	Non-corr	L4	80.4	91.1	94.8	Non-corr	L4
563-96-2	8.6	6.9	108.1	Cat 1B/1C	L1	3.9	10.9	101.7	Cat 1B/1C	L1	2.4	63.9	106.9	Cat 1B/1C	L5	2.2	59.0	103.1	Cat 1B/1C	L5
79-08-3	2.4	4.5	9.6	Cat 1A	L1	2.4	4.0	8.8	Cat 1A	L1	21.1	7.6	24.8	Cat 1A	L3	8.2	7.4	6.5	Cat 1A	L3

4.3 皮肤刺激性扮类结果

CAS#	第一组第一轮			第一组第二轮			第二组第一轮			第二组第二轮		
	via%	Prediction	Lab	via%	Prediction	Lab	via%	Prediction	Lab	via%	Prediction	Lab
86-87-3	71.6	NC	L1	111.1	NC	L1	59.8	NC	L2	57.6	NC	L2
111-25-1	18.2	Cat 2	L1	11.1	Cat 2	L1	22.9	Cat 2	L2	44.4	Cat 2	L2
563-96-2	24.4	Cat 2	L1	15.3	Cat 2	L1	23.5	Cat 2	L2	16.2	Cat 2	L2
79-08-3	1.3	Cat2	L1	2.1	Cat2	L1	4.7	Cat2	L2	3.6	Cat2	L2

同一实验室内的可重复性为 100%，不同实验室间的可重复性为 100%

4.4 整合测试结果

两种整合策略（自下而上，自上而下）均获得正确分类，且分类相同，不受所选用的测试策略顺序的局限。

自下而上策略	自上而下策略	UN GHS 分类

	预测分类	预测分类	
86-87-3	NC	NC	NC
111-25-1	Cat 2	Cat 2	Cat 2
563-96-2	Cat 1B/1C	Cat 1B/1C	Cat 1B/1C
79-08-3	Cat 1A	Cat 1A	Cat 1A

4.5 预测能力分析

两种整合策略（自下而上，自上而下）预测能力良好

	自下而上策略 % （正确分类/总数）	自上而下策略 % （正确分类/总数）
准确性 (Non-class vs. class)	100.0% (4/4)	100.0% (4/4)
准确性 (Non-class vs. Cat. 2) (OECD TG 439 only)	100.0% (2/2)	100.0% (2/2)
准确性 (Non-Cat. 1 vs. Cat. 1)	100.0% (4/4)	100.0% (4/4)
整体准确性 (Non-class, Cat. 2, Cat. 1B/1C, Cat. 1A)	100.0% (4/4)	100.0% (4/4)

4.6 验证结论

本次验证基于皮肤模型的整合策略，选择 OED439 和 431 作为组合中的标准方法，结果表明采用市场上可以选购的符合标准要求的中国 EpiSkin™人重建表皮模型的皮肤腐蚀性和皮肤刺激性测试数据可以用于自下而上（bottom-up）和自上而下（top-down）两种整合测试策略；中国 EpiSkin™人重建表皮模型的皮肤腐蚀性和皮肤刺激性测试在不同实验室间重复性良好；两种整合策略下，化学品均能获得正确分类，且分类相同，不受所选用的测试策略顺序的局限；该研究成功建立体外皮肤刺激性和腐蚀性测试整合策略的团体标准，为替代方法整合策略的推广奠定了坚实的科学基础

五、预期经济效果

1、推动化妆品行业替代方法的实施

动物实验替代方法起源于 1959 年罗素和伯齐倡导的“仁慈试验技术原理”，经过 60 年的发展，在国际上科学界、监管机构和验证机构的共同推动下，体外方法已广泛应用于监管科学、常规检测和科研服务。2009 年之后，从欧盟开始，世界上超过 50 个国家的化妆品法规禁止使用动物实验，转而使用替代方法。而我国的替代方法的使用不超

过 20 年的历史，许多标准化替代方法没有被系统引进，更谈不上对其开发和验证过程的熟悉，迫切需要对于这些方法的使用提供指导文件。目前动物试验替代方法的研发和转化应用面临解决四个重要问题：一是单一方法的局限性，二是复杂毒理学终点替代方法开发的问题，三是标准化方法转化应用中的质量控制和优化的问题，四是新技术和方法的验证问题。本标准针对第一个问题，以化学品/化妆品皮肤刺激性和腐蚀性的替代方法组合测试为目标，建立毒性预测的整合方案。

2、推动组合替代方法的实施

目前，被我国行业主管机构接受，以及行业使用的替代方法尽管还不是很多，但已有不少方法在行业内使用，甚至出现了随意组合的现象。即对组合中单一方法的验证和组合方法的验证缺少必要的共识和案例。本指南的制定有助于推动替代方法组合过程中提高预测准确性和成本效益，以及推动组合方法的规范化验证。

六、采标程度，国内外同类标准水平对比情况

测试和评估的整合方法(integrated assessment and testing approaches, IATA)是一个根据多种来源的信息用于化学品危害识别、危害特征描述和安全性评估的方法。一个 IATA 整合并权重了所有相关的现有的证据，并在有需要时指导产生目标性的新数据，以指导关于潜在危害和风险的法规决策制定。IATA 方案中，来自不同的信息源数据，如理化特征、计算机模型、分类方法和交叉参照方法、体外方法、体内试验和人的数据，进行评估和整合以得出关于化学品危害和风险的结论。

IATA 的目的是评估来自于化学品暴露的人类健康和环境的风险，IATA 是一个过程，运用全面的证据权重的方法，用以权衡和集成可以用到的化学品危害和暴露的信息和经验性数据。根据评估问题（急性刺激性还是慢性经口毒性）和保护目标（健康或环境），IATA 的构建模块(组件)可以组装成不同的方式，可以包括一系列不同的方法和信息来源。

表 2 OECD 发布的 IATA 文件

序号	OECD GD 编号	内容	发布时间
1	OECD GD 203	皮肤腐蚀性和刺激性的 IAT 的导则文件 Guidance Document on an Integrated Approach on Testing and Assessment (IATA) for Skin Corrosion and Irritation.	2014
2	250	来自IATA案例研究的报告--分类法作为 IAT的组成部分Report on Considerations from Case Studies	2017

		on Integrated Approaches for Testing and Assessment (IATA) - First Review Cycle (2015) : Case Studies on Grouping Methods as a Part of IATA	
3	263	严重眼损伤和眼刺激性的IATA导则文件（第二版）Second Edition - Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) for Serious Eye Damage and Eye Irritation	2019
4	260	使用AOP开发IATA的导则文件Guidance Document for the Use of Adverse Outcome Pathways in Developing Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA)	
5	256	报告定义性方法 和个性化信息用于皮肤致敏的IATA导则文件Guidance Document on the Reporting of Defined Approaches and Individual Information Sources to be Used within Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) for Skin Sensitisation	2017

本指南主要依据化妆品安全性最为关注的刺激性和腐蚀性的问题，以OECD比较成熟的基于皮肤模型的定义性方法为基础。以OECD关于皮肤腐蚀性和刺激性的IATA文件203号为依据，以定义性方法431和5439为基础方法。以国内可以实现与同际同步高质量供应的商品化皮肤模型EPISKIN为可靠皮肤模型供应商，提供满足化妆品和化学品使用的IATA指南。目前国内尚无类似指南标准，本标准发布将填补这一领域的空白。

七、重大分歧意见的自理和其他需要说明的事项

2020 年申请标准立项时得到学会标准化专家委员会的投票一致同意。标准编制过程和验证过程中得到参与实验验证单位和参与标准编制单位的积极响应。主要问题如下：

OECD 203 号文件指出，当现有数据存在不确定时，可以选择定义性方法建立组合。因此，基于皮肤模型的方法并不是唯一的补充数据缺口的方法，其缺点还表现在成本较高。现实测试中可能存在其他的组合方式，比如基于 435 与 439 的组合，431 与 439 的组合等。因此，对于本标准所界定的适用范围应在标准中给予较明确的说明。

替代动物实验的非常重要的原因是基于动物福利和 3R 原则的考虑，基于皮肤模型的组合方法，或者基于化学反应的组合方法（如 435）可能是动物福利程度较高的方法，而基于 431 作为组合的方法可能涉及实验动物的饲养和取材，动物福利程度较差。建议标准中补充关于 3R 有益性的描述。